

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



**DEUTSCHES
PATENTAMT**

② Offenlegungsschrift
② DE 4415480 A1

⑤ Int. Cl. 6:
G 01 N 27/62
G 01 N 27/447
G 01 N 1/28
B 05 B 5/025
G 01 N 33/68

① Aktenzeichen: P 44 15 480.1
② Anmeldetag: 2. 5. 94
③ Offenlegungstag: 9. 11. 95

⑦) Anmelder:
Bruker - Franzen Analytik GmbH, 28359 Bremen, DE

72 Erfinder:
Laukien, Frank, Lincoln, Mass., US; Franzen, Jo hñ, 28359 Bremen, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54) Vorrichtung und Verfahren zur massenspektrometrischen Untersuchung von Substanzgemischen durch Kopplung kapillarelektrophoretischer Separation (CE) mit Elektrospray-Ionisierung (ESI)

57 Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur massenspektrometrischen Analyse von kapillarelektrophoretisch separierten Substanzproben, insbesondere Proteinen, Proteoglykanen oder anderen Proteinkonjugaten, mit einer Ionisierung der Substanzproben durch eine besonders substanzsparsame Form des Elektrosprühens. Es wird dabei ein Verfahren des "Mikrosprühens" verwendet, das einen Fluß der Sprühflüssigkeit von nur einigen Zehn Nanolitern pro Minute bei stabilem Sprühbetrieb erlaubt. Die Erfindung besteht in einer losen Ankopplung der Sprühkapillare an die Elektrophoresekapillare in flüssiger Umgebung.

DE 44 15 480 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur massenspektrometrischen Analyse von kapillarelektrophoretisch separierten Substanzproben, insbesondere Proteinen, Proteoglykanen oder anderen Proteinkonjugaten, mit einer Ionisierung der Substanzproben durch Elektrosprühnen. Eine solche Methode ist beispielsweise aus der Arbeit von M. A. Moseley et al. in J. Am. Soc. Mass Spectrom. 3, 289 (1992) bekannt.

Allgemeiner Stand der Technik

a) Kapillar-Elektrophorese

Es gibt verschiedene Arten von Kapillarelektrophorese wie Kapillar-Zonen-Elektrophorese (CZE), Kapillar-Gel-Elektrophorese (CGE), Kapillar-Isotachophorese (ITP) und andere mehr, deren Art und Unterschiede aber hier nicht relevant sind. Auch die verschiedenen Beladungsmethoden der Kapillaren mit und ohne Substanzfokussierung sind hier nicht entscheidend. Einen guten Überblick über diese Methoden gewinnt man aus den Überblicksartikeln von Ring-Ling Chien und Dean S. Burgi, Anal. Chem. 64, 489A (1992) und von M. Albin, P. D. Grossman und S. E. Moring, Anal. Chem. 65, 489A (1993). Die neuere Literatur ist in der Übersicht von C. Schöneich et al., Anal. Chem. 65, 67R (1993) gegeben.

Entscheidend ist hier lediglich, daß die gemeinsam in einem Flüssigkeitsprop in die Kapillare eingebrachten Substanzen eines gelösten Gemisches aus schweren Molekülen, vorzugsweise Biomolekülen, unter der Einwirkung eines relativ starken elektrischen Feldes in der elektrolytischen Flüssigkeit, mit der die Kapillare gefüllt ist, zu wandern beginnen. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit der einzelnen Gemischkomponenten verschieden. Wie in der Chromatographie tritt eine Separation der Substanzen ein. Grund für diese Wanderung ist eine pH-Wert-abhängige Ladung der Biomoleküle.

Kapillarelektrophorese, insbesondere die Kapillarzonenelektrophorese, hat gegenüber anderen Trennmethoden, beispielsweise der Flüssigkeitschromatographie, den großen Vorteil, in kurzer Trennzeit extrem gute Separationen zu erzielen. So lassen sich in weniger als 20 Minuten Separationen mit mehr als einer Million theoretischer Böden erreichen, in weniger als einer Minute Bödenzahlen größer als 100 000.

Normalerweise befinden sich beide Enden der Kapillare in je einem Flüssigkeitsreservoir, in dem sich auch die beiden spannungsgebenden Elektroden befinden. Kurz vor dem zweiten Flüssigkeitsreservoir befindet sich für gewöhnlich eine Detektionseinrichtung, die die getrennten Substanzen während des Flusses durch die Kapillare durch Absorption von sichtbarem oder UV-Licht in der Kapillare mißt.

In der elektrophoretischen Kapillare fließen drei elektrische Teilströme: (1) der elektrolytische Strom durch die wandernden Substanzionen, deren Ladung vom pH-Wert der Lösung abhängt, (2) ein elektroosmotischer Strom durch die Einwirkung von ortsfesten Wandladungen auf die Lösung, und (3) ein meist überwiegend großer elektrolytischer Strom durch pH-Wert-bestimmende Säuren, Basen oder Salze der Lösung. Alle Arten von Kapillarelektrophorese haben dabei den Vorteil, daß die Wärme, die durch diese Ströme entsteht, sehr gut von den Kapillarwänden abgeleitet wird, und daher relativ große Stromdichten möglich werden.

Der elektroosmotische Effekt besteht darin, daß durch ortsfeste Wandladungen, die durch den Elektrolyten entstehen, in der Flüssigkeit bewegliche Ladungen induziert werden, die unter der Potentiendifferenz zu einem elektrischen Strom, aber auch zu einem elektroosmotischen Flüssigkeitststrom führen. Durch den elektroosmotischen Flüssigkeitsstrom wird Flüssigkeit in geringen Mengen durch die Kapillare gepumpt. Richtung und Größe des Flüssigkeitsstromes hängen dabei von der Art der Wandladungen, vom Kapillardurchmesser, von der Feldstärke und der Polarität des elektrischen Feldes ab.

Die Wandladungen lassen sich durch Belegungen der Kapillarwand mit Polymeren beeinflussen. Beispielsweise werden in einer unbelegten Quarzkapillare negative Wandladungen erzeugt. Durch Bindung bestimmter organischen Verbindungen an die Wand, beispielsweise durch Aminopropylsilylierung, können dagegen positive Wandladungen erzeugt werden. Bei Nutzung von Wandadsorptionen der zu trennenden Substanzen und für eine gute elektrophoretische Separation ist es wichtig, gleiche Ladungspolarität von Wandladungen und Substanzionen herzustellen. Für die gute Trennung von Proteinen in einem angesäuerten Elektrolyten, der durch Anlagerung von H⁺-Ionen eine positive Ladung der Proteinmoleküle bewirkt, müssen auch positive Wandladungen erzeugt werden, da nur dann die Substanzionen durch die Coulombkräfte von den Wänden entfernt gehalten werden.

Die elektroosmotische Strömung ist im allgemeinen recht klein, kann aber einen kräftigen Druck aufbauen, der sich jedoch durch einen hydrostatischen Gegendruck kompensieren läßt, wenn man einen bestimmten Flüssigkeitsstrom zwangsweise erzeugen möchte. Die elektroosmotische Strömung ist aber im allgemeinen weit unter 0,3 Mikroliter pro Minute in einer Kapillare mit 75 Mikrometern innerem Durchmesser, die Strömungsgeschwindigkeit reicht nur selten an die Wanderungsgeschwindigkeit der langsamsten Substanzmoleküle heran.

b) Elektrosprühionisieren

Ein guter Überblick über Elektrosprühionisieren und den heutigen Stand der Technik ist in folgendem Review-Artikel gegeben: J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong und C. M. Whitehouse; Spectr. Rev. 9, 37 (1990).

In der Elektrosprüh-Methode liegt zwischen einer Metallkapillare und einer ebenen Fläche, die einen Abstand von etwa 20 bis 50 Millimeter voneinander haben, eine Spannung von mehreren Kilovolt an. Eine Flüssigkeit in der Kapillare wird dabei unter der Wirkung des elektrischen Feldes am Ende der Kapillare dielektrisch polarisiert und zu einem Konus ausgezogen, dem sogenannten Taylor-Konus. An der Spitze dieses Konus kann die Oberflächenspannung der Flüssigkeit der ziehenden Kraft des elektrischen Feldes nicht mehr standhalten, daher reißt hier ein kleines Tröpfchen ab, das wegen der dielektrischen Polarisierung elektrisch aufgeladen ist. Das geladene Tröpfchen fliegt unter der Wirkung des inhomogenen elektrischen Feldes zunächst stark beschleunigt auf die ebene Gegenelektrode zu, wird aber in der umgebenden Luft abgebremst. Während des Fluges tritt von der Oberfläche des Tröpfchens eine starke Verdunstung ein. Befinden sich in der Flüssigkeit einige größere Moleküle, die sich durch Elektronenentzug, durch Elektronenanzug, durch

Protonierung oder sonst leichter laden (ionisieren) lassen als die Moleküle der Flüssigkeit, so können im günstigen Falle nach vollständiger Verdampfung der Flüssigkeit die größeren Moleküle in ionisierter Form zurückbleiben. Die ionisierten Moleküle fliegen dabei unter der Wirkung des elektrischen Feldes durch den bekannten Prozeß der "Ionenmobilität" weiter auf die Gegenelektrode zu, und können durch eine feine Öffnung oder durch eine Kapillare in das Vakuumsystem eines Massenspektrometers überführt werden.

Das Abreißen der Tröpfchen findet, abhängig vom Nachschub der Flüssigkeit in der Kapillare, außerordentlich häufig statt, so daß gewöhnlich ein kontinuierlicher Ionenstrom entsteht. Der Nachschub wird durch eine sehr gleichmäßig arbeitende Pumpe, meist eine Spritzenpumpe, aufrechterhalten.

Die größeren Moleküle werden bei diesem Vorgang meist nicht nur einfach geladen, sondern vielfach. Als grobe Regel gilt, daß die mittlere Ladungszahl umso größer ist, je größer das Molekül ist. Große Biomolekülen können durchaus 10- bis 50 mal geladen sein. Die Ladung ist in der Regel nicht eine einfache Ionisierung, sondern eine Protonierung, also eine Bindung mit geladenen Wasserstoffatomen H^+ . Daher hängt die Ionisierung auch stark von der Wasserstoff-Ionen-Konzentration (also vom pH-Wert) der Lösung ab. Um die Ionen einer mittleren Ladungszahl herum gibt es eine breite Verteilung von Ionen mit verschiedenen Anzahlen von Ladungen.

Die vielfache Ladung eines größeren Moleküllions und die breite Ladungsverteilung sind einesseits besonders günstig für den Nachweis. Da die meisten Massenspektrometer einen beschränkten Massenbereich haben (genauer ausgedrückt: einen beschränkten Bereich der Massen-zu-Ladungs-Verhältnisse), kann man trotz dieser Beschränkung noch sehr große Moleküle weit jenseits des Massenbereichs, der für einfach geladene Ionen definiert ist, nachweisen, da die Elektro-Sprüh-Ionen vielfach geladen sind. Durch die breite und regelmäßige Verteilung der Anzahl der Ladungen auf die Moleküllionen gleicher Masse ist es außerdem leicht möglich, die Molekularmasse rechnerisch zu bestimmen (M. Mann, C. K. Meng und J. B. Fenn, Anal. Chem. 61, 1702 (1989)).

Die Tröpfchen haben bei dieser normalerweise verwendeten Methode mit Metallkapillaren einen sich selbst einstellenden Durchmesser von ein bis zwei Mikrometern, gegeben durch Dielektrizitätskonstante, Viskosität, Flußrate und Oberflächenspannung der Flüssigkeit. Eine stabile Betriebsweise des Elektrosprühens läßt sich nur aufrechterhalten, wenn der Flüssigkeitsstrom größer als etwa ein Mikroliter pro Minute ist. Die stabile Betriebsweise wird darüber hinaus durch die Eigenschaften der Sprühflüssigkeit bestimmt, darunter von pH-Wert, Viskosität, Oberflächenspannung und Leitfähigkeit. Nur in schmalen Toleranzbereichen dieser Parameter ist ein stabiles Sprühen möglich.

In der nicht vorveröffentlichten Patentanmeldung DE 44 08 032.8, auf die hier vollinhaltlich Bezug genommen wird, wird eine verbesserte Methode der Elektrosprüh-Ionisierung angegeben, die zu wesentlich kleineren Tröpfchengrößen, zu stabilem Betrieb und zu geringerem Flüssigkeitsstrom führt. Es werden für dieses Verfahren, das im Folgenden "Mikrosprühen" genannt wird, Kapillaren aus Glas benutzt, die zu sehr feinen Spitzen mit Öffnungsdurchmessern von nur etwa 2,5 Mikrometer ausgezogen worden sind. Die Glaskapillaren liefern, bei völlig stabilem Betrieb, Tröpfchen von

etwa 100 bis 200 Nanometern Durchmesser, die wegen ihres hohen Dampfdrucks, ihrer geringeren Abkühlung durch die Verdunstung und ihrer kleinen Masse bereits bei Zimmertemperatur auf einer Flugstrecke von nur 1,5 Millimetern vollständig verdunsten.

Es ist ein besonderes Merkmal dieses neuen Verfahrens, ohne Flüssigkeitsspumpe zu arbeiten, wie sie bei allen sonst verwendeten Verfahren benutzt wird. Es ergibt sich eine Selbstregulierung des Nachflusses mit der Folge eines sehr konstanten Ionenstroms, wobei der Nachschub an Lösung bei niederviskosen Flüssigkeiten allein durch die elektrischen Ziehkräfte bewerkstelligt wird. Bei höherviskosen Flüssigkeiten genügte ein leichter Gas-Überdruck am Ende der Kapillare, um zu einem selbstregulierenden Nachfluß zu kommen. Der Gasdruck braucht und darf dabei nicht so hoch sein, daß bei Abschalten des Sprühvorgangs ein Ausfluß der Flüssigkeit aus der Kapillare bewirkt wird. Der selbstregulierende Nachschub an Flüssigkeit ist wesentlich für einen stabilen Betrieb des Sprühens mit so geringen Flußraten.

Es sind weitere Vorteile dieses Verfahrens, daß die Sprühspannung nur etwa 600 bis 800 Volt beträgt, und daß sich das Sprühen durch eine Absenkung dieser Spannung um einige hundert Volt leicht vollständig unterbrechen läßt. Damit lassen sich insbesondere bei speichernden Massenspektrometern, wie Hochfrequenz-Quadrupol-Ionenfalle und Ionen-Cyclotron-Resonanz-Spektrometern, substanzsparende Verfahren entwickeln, bei denen der Sprühionenstrahl nur in der Füllungszeit der Ionenfallen eingeschaltet wird, in der Analysenzeit dagegen ausgeschaltet bleibt.

Der größte Vorteil des Mikrosprühens ist aber die Toleranz des Verfahrens gegenüber starken Änderungen der elektrolytischen oder viskosen Eigenschaften der Flüssigkeit. Es können sowohl sauberstes Wasser, wie auch Säuren und Basen im pH-Wertbereich von 0,2 bis 10 gesprührt werden. Auch stärkere Zusätze von organischen Lösemitteln, wie beispielsweise Methanol oder Acetonitril, verhindern ein stabiles Sprühen nicht, während das klassische Elektrosprühverfahren nur in sehr schmalen Toleranzbereichen für alle diese Parameter stabil arbeitet.

Der Sprühstrahl zeigt auf dem kurzen Wege zur Gegenelektrode eine nur sehr geringe Verbreiterung von etwa 200 Mikrometern, so daß die Ionen praktisch vollständig durch eine feine Kapillare ins Vakuum des Massenspektrometers überführt werden können.

Verglichen mit einer konventionellen Elektro-Spray-Einrichtung, die mit einer Lösung gleicher Konzentration arbeitete, ist der Ionenstrom im Massenspektrometer etwa zwei- bis dreimal höher. Der Lösungsmittelfluß, und damit der Substanzerbrauch, liegt aber um den Faktor 40 niedriger als der niedrigste Fluß, der sich in konventionellen Verfahren noch stabil einstellen läßt. Die Flußrate beträgt nur 25 Nanoliter pro Minute. Die Ausbeute an Ionen, gemessen an der eingesetzten Substanzmenge, ist damit um einen Faktor 100 erhöht.

c) Massenspektrometrische Untersuchung

Für die Untersuchung der Sprühionen läßt sich im Prinzip jede Art von Massenspektrometer einsetzen, da die kontinuierliche Ionenerzeugung hier keinerlei Beschränkungen auferlegt. Es kommen sowohl die klassischen Sektorfeld-Spektrometer, wie auch Quadrupol-Spektrometer in Frage, beide Arten auch in Tandem-Anordnung, um MS/MS-Untersuchungen vornehmen

zu können.

Flugzeit-Massenspektrometer brauchen eine Auspulung des quer eingeschossenen Ionenstrahls, können dann aber auch vorteilhaft genutzt werden. Die Ausbeute der zur Messung genannten Ionen ist hier höher als bei den als Filter für jeweils eine einzige gemessene Masse wirkenden Sektorfeld- oder Quadrupol-Spektrometern.

Besonders günstig sind hier speichernde Massenspektrometer, wie Quadrupol-Ionenfallen oder Ionen-Cyclotron-Resonanz-Geräte. Durch die Abschaltbarkeit des Mikrosprühverfahrens braucht der Ionenstrahl nur dann eingeschaltet sein, wenn die Speicherzelle mit Ionen zu füllen ist.

Die Ziele der massenspektrometrischen Analysen können sehr verschieden sein. Die einfachsten sind genaue Molekulargewichtsbestimmungen von Proteinen in Gemischen, oder Identifizierung von Proteinen oder Proteoglykanen durch Molekulargewichtsbestimmung der enzymatisch erzeugten Abbauprodukte wie Peptide oder Oligosaccharide. Zu den schwierigeren Analysen gehören Bestimmungen der Aminosäuresequenzen über MS/MS-Methoden oder Analysen der Tertiärstrukturen großer Biomoleküle.

d) Kopplung Elektrophorese mit Elektrosprühen

Die klassische Elektrosprüh-Ionisierung wie auch das neue Mikrosprühen haben für Analysen von Substanzgemischen einen entscheidenden Nachteil: Durch die breite Verteilung der Ladungszustände ergeben sich sehr linienreiche Spektren. Bei Vorliegen einer reinen Substanz ist dies vorteilhaft, wie oben beschrieben, da man aus dem regelmäßigen Rhythmus der Linien leicht das Molekulargewicht bestimmen kann. Selbst bei drei gleichzeitig ionisierten Substanzen läßt sich das Schema aus den überlagerten Spektren noch entschlüsseln. Bei der Überlagerung von mehr als drei Substanzen wird das Spektrum aber schnell völlig unübersichtlich. Es muß also einer Gemischanalyse, wie sie gerade bei Biomolekülen oft vorkommt, immer eine mehr oder weniger vollständige Separation der Substanzen vorhergehen. Eine Kopplung mit einem separierenden Verfahren liegt daher nahe.

Eine Kopplung der Kapillarzonenelektrophorese mit Elektrosprühionisierung und massenspektrometrischem Nachweis wurde in der schon eingangs erwähnten Arbeit von M. A. Moseley et al. in J. Am. Soc. Mass Spectrom. 3, 289 (1992) beschrieben. Dort wird auch frühere Literatur angegeben. Es war ein besonderes Ziel dieser Arbeit, den Einfluß verschiedener Flüssigkeitsparameter auf das Elektrosprühen zu untersuchen.

Die Kapillarelektrophorese wurde bisher, wie auch in der zitierten Arbeit, nur mit dem klassischen Elektrosprühverfahren gekoppelt, nicht mit dem Mikrosprühen. Es wurde dabei stets die Kapillarzonenelektrophorese benutzt. Um die verschiedenen großen und verschiedenen gerichteten elektroosmotischen Flüssigkeitsströme zu kompensieren, wurde meist ein Flüssigkeitsstrom durch eine Druckdifferenz über die Kapillare zwangsläufig eingestellt. Dieser ist jedoch viel zu klein für ein stabiles Elektrosprühen, daher wurde dem Elektrosprühen in allen bisherigen Arbeiten koaxial ein Überschuß an zusätzlichem Flüssigkeitsstrom zugeführt. Die Elektrophoresekapillare wurde dabei direkt in die Metallkapillare für die Zusatzflüssigkeit eingeschoben. In der zitierten Arbeit von Moseley et al. wurde die Elektrophoresekapillare an der Sprühstelle um etwa 0,2 Millimeter her-

ausragen lassen. Der überschüssige Strom an zugegebener Flüssigkeit wurde dazu benutzt, um die Sprühparameter richtig einzustellen.

Nachteile bisheriger Verfahren

Wie die Untersuchungen von Moseley et al. ergeben haben, wird durch die Einstellung optimaler Sprühparameter durch die Zusatzflüssigkeit keine Entkopplung von den Eigenschaften der elektrophoretischen Flüssigkeit erzeugt. Auch diese müssen optimal für die Ionisierung im Elektrosprühen eingestellt werden. Eine Unabhängigkeit zwischen Elektrophorese und Elektrosprühnen ist daher nicht zu erreichen. Entgegen den Erwartungen liegt also hier kein Vorteil der Methode.

Andererseits wird die Konzentration der zu analysierenden Substanzen durch die Zusatzflüssigkeit stark herabgesetzt. Die Überführungsausbeute der Elektrosprühionen des klassischen Sprühverfahrens in das Vakuum des Massenspektrometers ist außerordentlich klein, nur etwa 1/1000 der Ionen gelangen in das Massenspektrometer. Die Substanzausbeute dieses Verfahrens ist daher sehr klein.

Außerdem ist dieses Verfahren durch die Zuführung einer zweiten Flüssigkeit, durch den Zwang zu einer genauen Einstellung aller elektrolytischen Parameter für diese Flüssigkeit und durch die erforderliche Pumpe und deren Einstellung sehr kompliziert und nicht leicht zu einem stabilen Arbeiten zu bringen.

Aufgabe der Erfindung

Es ist eine Vorrichtung und ein Verfahren zu finden, mit dem separierte Proteine und andere Biomoleküle aus der Kapillarelektrophorese kontinuierlich und mit hoher Ausbeute an massenspektrometrisch detektierbaren Ionen einer Ionisation durch das besonders günstige Mikrosprühen zugeführt werden können, ohne durch zusätzlich zugeführte Flüssigkeit eine Verdunng zu erleiden.

Erfindungsgedanke

Es ist der Grundgedanke der Erfindung, die beiden Kapillaren in der Flüssigkeit des zweiten Flüssigkeitsreservoirs koaxial lose miteinander zu koppeln, wobei ein schmaler Spalt zwischen den Stirnflächen der Kapillaren die elektrische und hydrodynamische Verbindung zur Flüssigkeit des Reservoirs übernimmt. Durch diese lose Kopplung wird sichergestellt, daß sich kein Zwangslauf in der Mikrosprühkapillare einstellt, sondern daß sich der Fluß selbstregulierend einstellen kann, wie es für den Erfolg des Mikrosprühens notwendig ist. Es wird weiterhin sichergestellt, daß der elektrische Strom durch die Elektrophoresekapillare und der Strom durch die Mikrosprühkapillare, der für das Sprühen notwendig ist, voneinander entkoppelt sind. Insbesondere braucht der Elektrophoresestrom nicht durch die sehr feine Spitze der Mikrosprühseinrichtung geführt werden, da dort eine so hohe Stromdichte herrschen würde, daß ein Sieden der Elektrophoreseflüssigkeit nicht auszuschließen wäre. Die Spannung für das Mikrosprühen ist von der Spannung für die Elektrophorese unabhängig, beide können unabhängig voneinander optimal eingestellt werden.

Der Spalt sollte dabei etwa 1/4 des inneren Durchmessers der Elektrophoresekapillare betragen, da dann keine Erhöhung der elektrischen Stromdichte und auch

kein Erhöhung der substanzführenden Feldstärke auftritt. Es tritt dann auch keine übermäßige Erwärmung des Elektrolyten an dieser Stelle auf.

Die Polarität der wandernden Substanzen in der Elektrophoresekapillare und die der Sprühionen muß dabei gleich sein, da sich nur dann in der Mikrosprühkapillare durch den elektrischen Sprühstrom ein Potentialgefälle ausbildet, das die Substanzen zur Spitze der Sprühkapillare führt, wenn sie einmal in die Mikrosprühkapillare eingetreten sind.

Der Innendurchmesser der Mikrosprühkapillare sollte klein sein, damit sich eine relativ große Strömungsgeschwindigkeit einstellt, die viele der separierten Substanzen, die aus der Elektrosprühkapillare austreten, durch Flüssigkeitsreibung in die Mikrosprühkapillare mitnimmt, auch wenn die höhere Feldstärke im Spalt die Ionen nach außen abzuleiten sucht.

Die Präparation der Innenwände der beiden Kapillaren muß gleich oder zumindest ähnlich sein, um eine gleiche Polarität der Wandladungen zu erzeugen. Die Polarität der Wandladungen sollte der Polarität der wandernden Substanzen entsprechen, um ein optimales Trennergebnis zu erhalten. Auch die Stirnflächen der Kapillaren, die den Spalt bilden, sollen vorzugsweise in dieser Weise präpariert sein.

Es lassen sich auf diese Weise mehr als 20 Prozent der interessierenden Substanzen in die Mikrosprühkapillare überführen, der Rest wandert in das zweite Flüssigkeitsreservoir und ist verloren. Diese Ausbeute erscheint zunächst gering, da sich ja bei den bisherigen Kopplungsverfahren alle Substanzen dem Elektrosprühverfahren zugeführt werden. Da aber die Ausbeute an massenspektrometrisch nutzbaren Ionen beim Mikrosprühverfahren um einen Faktor hundert höher liegt als bei der klassischen Elektrosprühmethode, wird mit der losen Kopplung ein mehr als zwanzigfacher Gewinn an Substanzen erzielt.

Es ist ein besonderer Vorteil dieser Kopplung, daß sich sowohl das Mikrosprühren wie auch die Kapillarelektrophorese leicht elektrisch abschalten lassen, ohne die Separation wesentlich zu stören. Insbesondere zeigt die Kapillar-Gel-Elektrophorese keine Beeinträchtigung der Separationsleistung durch zwischenzeitliches Abschalten. Das Mikrosprühren kann man innerhalb einer Millisekunde abschalten und in derselben Zeitspanne auch einschalten. Damit läßt sich eine sehr genaue Dosierung der Ionen erreichen.

Durch die Möglichkeit, nur dann Ionen zu erzeugen, wenn sie gebraucht werden, kann man den Subanzverbrauch der massenspektrometrischen Untersuchung unter Benutzung von speichernden Massenspektometern nochmals herabsetzen. Sowohl bei Quadrupol-Lochfallen wie auch bei Ionen-Cyclotron-Spektrometern braucht man nur etwa 20 Millisekunden, um die Speicherzelle mit genügend Ionen zu füllen. Für die massenspektrometrische Analyse der gespeicherten Ionen werden dann, je nach erforderlichem Auflösungsvermögen und nach Analysenart, 100 Millisekunden bis eine Sekunde gebraucht. Durch entsprechendes Schalten kann man also zu weiteren Subanzinsparungen um Faktoren fünf bis fünfzig kommen, allerdings unter Verlängerung der gesamten Analysendauer. Durch getrenntes Schalten von Elektrophorese und Sprühen läßt sich auch jeder Zwischenwert erreichen.

Beschreibung der Bilder

Fig. 1 zeigt ein Prinzipbild der gesamten Kopplung

ausschließlich Blich des Massenspektrometers.

Die Elektrophoresekapillare (1) verbindet die beiden Flüssigkeitsreservoir (2) und (3), in denen sich (wie auch in der Elektrophoresekapillare) die Elektrophoreseflüssigkeit (4), (5) befindet. Die Elektrode n (6) und (7) können eine Spannung zwischen den beiden Flüssigkeitsreservoirn aufrechterhalten. Über die beiden Gaszuführungen (8) und (9) läßt sich erwünschter Gasdruck in den Gasräumen (10) und (11) über den beiden Spiegeln der Flüssigkeit einstellen. Die Mikrosprühkapillare (12) ist in der Elektrophoreseflüssigkeit (5) des Flüssigkeitsreservoirs (3) mit geringem Abstand koaxial zur Elektrophoresekapillare (1) angeordnet. Der Sprühstrahl wird durch eine Spannung zwischen der Elektrode (7) im zweiten Flüssigkeitsreservoir (3) und der Sprüh-Gegenelektrode (13) erzeugt, und die Sprühionen können in üblicher Weise durch eine feine Eintrittskapillare (14) in das Vakuum des Massenspektrometers eintreten.

Fig. 2 zeigt eine Vergrößerung der losen Kopplung der Elektrophoresekapillare (1) mit der Mikrosprühkapillare (12) im Flüssigkeitsreservoir (3). Der Abstand zwischen den Kapillaren beträgt nur etwa 1/4 des inneren Durchmessers der Elektrophoresekapillare (1).

Fig. 3 zeigt die lose Kopplung, ummantelt mit einem Haltelement (15) aus einem geeigneten Kunststoff, das einerseits die Kapillaren (1) und (12) zueinander fixiert, und andererseits den Flüssigkeits- und den elektrischen Strom in günstiger Weise führt.

Besonders günstige Ausführungsformen

Die Grundausführung der Erfindung ist bereits in Fig. 1 ausführlich beschrieben.

Einer Kapillarelektrophoresekapillare mit einem Innendurchmesser von 50 Mikrometern steht mit einer Spaltweite von etwa 15 Mikrometern eine Mikrosprühkapillare mit 20 Mikrometer Innendurchmesser gegenüber. Für massenspektrometrische Untersuchungen braucht das Separationsvermögen nicht extrem hoch zu sein, daher genügt meist eine relativ kurze Elektrophoresekapillare von etwa 20 Zentimetern Länge, betrieben mit einer Spannung von etwa 6 Kilovolt. Die Mikrosprühkapillare ist nur etwa 2 Zentimeter lang, und zu einer Spitze mit 2,5 Mikrometer Innendurchmesser ausgezogen. Die Fließgeschwindigkeit in der Mikrosprühkapillare beträgt dann etwa ein Millimeter pro Sekunde, die Subanz erscheint also etwa 20 Sekunden nach Eintritt in diese Kapillare. Ein Überdruck von etwa 100 000 Pascal im Gasraum des zweiten Flüssigkeitsreservoirs hilft, das Mikrosprühren mit wäßrigen Lösungen aufrechtzuerhalten.

Der Abstand zwischen der Spitze der Mikrosprühkapillare und der Gegenelektrode beträgt im optimalen Fall nur etwa 1,5 Millimeter. Die Gegenelektrode enthält dabei die metallisierte Stirnfläche einer Eintrittskapillare in das Massenspektrometer, mit einem Innendurchmesser von etwa 500 Mikrometern. Die Sprühspannung beträgt etwa 600 bis 800 Volt.

Besonders günstig für die normalerweise analysierten positiven Sprühionen ist dabei eine Ausführungsform der Elektrophoresekapillare aus Quarzglas, die innen mit einer Aminopropylsilylierung behandelt sind, die bei angesäuerten Elektrolyten positive Wandladungen erzeugen. Eine Rezeptur ist bei Moseley et al angegeben.

Eine weitere günstige Ausführungsform des Verfahrens sieht vor, durch entsprechende Einstellung der Drücke in den beiden Flüssigkeitsreservoirn eine ge-

genläufige Flußrichtung der Flüssigkeit in den beiden Kapillaren zu erzeugen. Dadurch entsteht ein relativ starker, saugender Flüssigkeitsstrom im Spalt, der den Übertritt der untersuchten Substanzen in die Mikrosprühkapillare begünstigt. Die Elektrophorese findet dann gegen den Flüssigkeitsstrom in der Elektrophoresekapillare statt.

Es ist günstig, die Halterung für die gegenseitige Fixierung der Kapillaren mit einem Kanal zu versehen, dessen Ausformung für eine hohe Überführungsrate der Substanzen in die Mikrosprühkapillare günstig ist. Es hat sich gezeigt, daß eine Umlenkung des Flüssigkeitsstromes, wie in Fig. 3 gezeigt, eine günstige Wirkung hat.

Patentansprüche

- Vorrichtung für die massenspektrometrischen Analyse von Elektrosprühionen kapillarelektrophoretisch getrennter Substanzen, mit einer Einrichtung zur Kapillarelektrophorese (CE) bestehend in üblicher Weise aus zwei elektrodenbevölkerten Flüssigkeitsreservoirn, zwischen denen sich eine Elektrophoresekapillare befindet, und einer Spannungsversorgung für die Elektrophoresespannung zwischen den beiden Elektroden, dadurch gekennzeichnet,
 - daß für das Elektrosprühen eine Mikrosprühseinrichtung verwendet wird, bestehend aus einer kurzen Mikrosprühkapillare, die einseitig zu einer feinen Kapillarspitze geformt ist, einer Sprüh-Gegenelektrode vor der Spitze der Mikrosprühkapillare, einer feinen Perforation in der Sprüh-Gegenelektrode, durch die Sprühionen in das Vakuum eines Massenspektrometers gelangen können, und einer Spannungsversorgung für das Mikrosprühen, und
 - daß dasjenige Ende der Mikrosprühkapillare, das nicht zu einer feinen Kapillarspitze geformt ist, in das zweite Flüssigkeitsreservoir der Elektrophoreseeinrichtung hineinragt und dort koaxial und in geringem Abstand zum Ende der Elektrophoresekapillare fixiert ist.
- Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Spannung der Spannungsversorgung für das Mikrosprühen zwischen der Elektrode im zweiten Flüssigkeitsreservoir und der Sprüh-Gegenelektrode der Mikrosprühseinrichtung angeschlossen wird.
- Vorrichtung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Entfernung der Sprühkapillarspitze von der Sprüh-Gegenelektrode etwa 0,5 bis 3 Millimeter mißt, und die Spannung zwischen der Elektrode im zweiten Flüssigkeitsreservoir und der Sprüh-Gegenelektrode der Mikrosprühseinrichtung etwa 500 bis 1200 Volt beträgt.
- Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrophoresekapillare einen inneren Durchmesser von 25 bis 100 Mikrometer und die Elektrosprühkapillare einen inneren Durchmesser von 10 bis 50 Mikrometer hat.
- Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Flüssigkeitsreservoir geschlossen und mit einer Gaszufuhr versehen ist, mit der das Gas oberhalb der Flüssigkeit mit einem Druck beaufschlagt werden kann, um das Sprühen der Mikrosprühkapillare

zu begünstigen.

6. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Spalt zwischen Elektrophoresekapillare und Sprühkapillare von einem elektrisch isolierendem Mantel 1 umgeben ist, der den Flüssigkeits- und elektrischen Strom so führt, daß besonders viel separierte Substanz in die Sprühkapillare gelangt.

7. Vorrichtung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Mantel so geformt ist, daß er auch die räumliche Fixierung der beiden Kapillaren zu einander vornimmt.

8. Verfahren zur massenspektrometrischen Analyse von Elektrosprühionen kapillarelektrophoretisch getrennter Substanzen, dadurch gekennzeichnet, daß eine einseitig zu einer feinen Kapillarspitze geformte Mikrosprühkapillare mit dem anderen Ende koaxial und mit geringem Spalt in der Elektrophoreseflüssigkeit zum Ende der Elektrophoresekapillare fixiert ist.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der Elektrophoreseflüssigkeit, die den Spalt umgibt, und einer Gegenelektrode, die sich vor der Spitze der Mikrosprühkapillare befindet, eine Spannung so eingestellt wird, daß ein Elektrosprühen aus der Mikrosprühkapillare stattfindet.

10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Gegenelektrode perforiert ist, und daß durch die Perforation Ionen in das Massenspektrometer eintreten.

11. Verfahren nach Ansprüchen 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Entfernung der Sprühkapillarspitze von der Gegenelektrode etwa 0,5 bis 3 Millimeter mißt, und die Spannung zwischen der Elektrophoreseflüssigkeit und der Gegenelektrode der Mikrosprühseinrichtung etwa 500 bis 1200 Volt beträgt.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrophoresekapillare einen inneren Durchmesser von 25 bis 100 Mikrometer und die Elektrosprühkapillare einen inneren Durchmesser von 10 bis 50 Mikrometer hat.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Elektrosprühen abgeschaltet wird, wenn die massenspektrometrische Analyse keinen Ionenstrom braucht.

14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Elektrosprühen abgeschaltet wird, indem die Spannung zwischen der Elektrophoreseflüssigkeit und der Gegenelektrode um einige Hundert Volt abgesenkt wird.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrophorese durch Abschalten der Elektrophoresespannung abgeschaltet wird, wenn die massenspektrometrische Analyse keinen Ionenstrom braucht.

16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Elektrophoreseflüssigkeit um den Spalt herum in einem geschlossenen Gefäß so mit einem Druck beaufschlagt wird, daß das Sprühen der Mikrosprühkapillare begünstigt, aber bei Abschalten der Sprühspannung kein Ausfluß der Flüssigkeit aus der feinen Kapillarspitze bewirkt wird.

17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Spalt

zwischen einer Elektrophoresekapillare und Sprühkapillare von einem elektrisch isolierendem Mantel umgeben ist, der den Flüssigkeits- und elektrischen Strom so führt, daß besonders viel separierte Substanz in die Sprühkapillare gelangt.

18. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Mantel so geformt ist, daß er auch die räumliche Fixierung der beiden Kapillaren zueinander vornimmt.

5

10

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

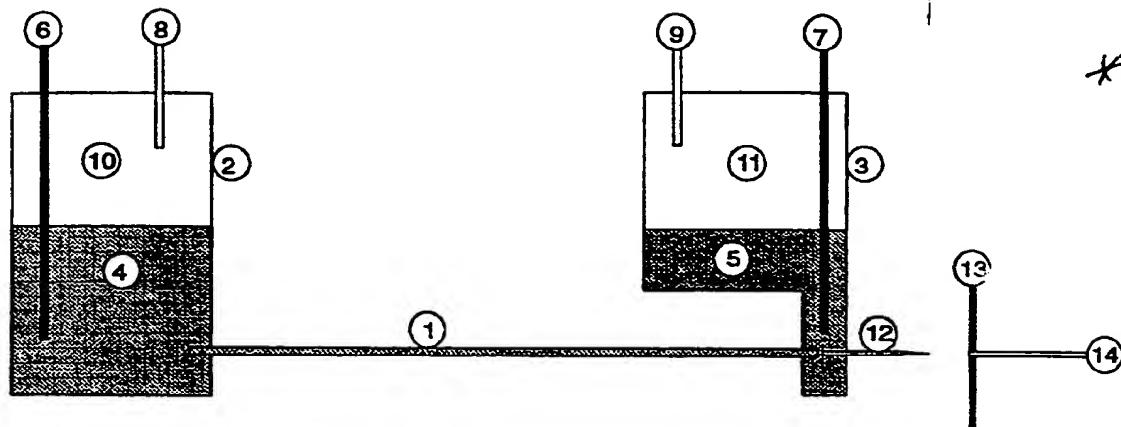


Fig. 1

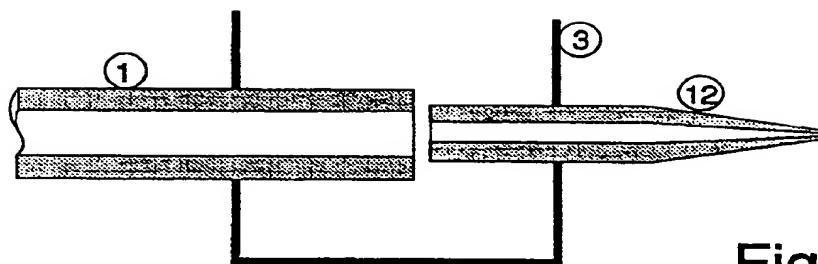


Fig. 2

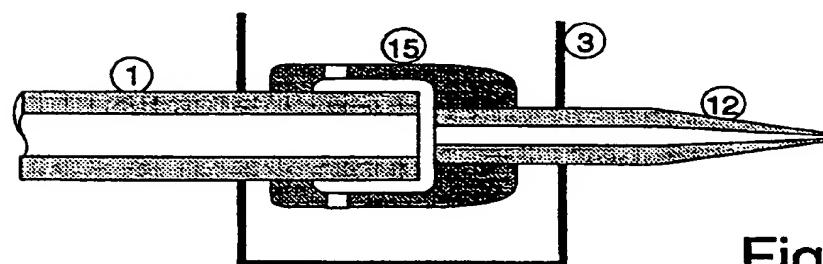


Fig. 3